黑腹果蝇 *Mst*84*Db* 敲降引起的父本缺陷类似 *Wolbachia* 诱导的细胞质不亲和

王翠平，郑　雅，郑金晶，王玉凤*

（华中师范大学生命科学学院，遗传调控与整合生物学湖北省重点实验室，武汉 430079）

摘要：【目的】*Wolbachia* 是广泛存在于昆虫体内的一类通过母系传递的共生菌，能够通过多种方式影响宿主的生殖。细胞质不亲和（CI）是 *Wolbachia* 引起的最普遍的一种表型，即感染 *Wolbachia* 的雄性和未感染的雌性宿主交配后，胚胎发育停滞于早期阶段。但目前有关 CI 的分子机理还不清楚。本研究组前期实验表明，*Wolbachia* 感染引起黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 3 龄幼虫精巢中 *Mst*84*Db* 基因的表达显著下调。本研究的目的是进一步研究 *Mst*84*Db* 与 CI 的关系。【方法】我们体外合成了 *Mst*84*Db* 的双链 RNA（dsRNA），注射雄性果蝇，将注射过的雄果蝇与野生雌果蝇交配，检测其繁殖力。基因表达采用定量 RT-PCR 方法进行检测。胚胎表型采用 DAPI 染色进行分析。【结果】注射 dsRNA 24 h 后，*Mst*84*Db* 基因的表达水平发生显著下调。注射后 72 h，基因表达下调幅度最大。与对照组相比，基因敲降后的雄蝇繁殖能力显著下降，与雌果蝇交配后胚胎孵化率显著低于对照组，这与 *Wolbachia* 诱导的 CI 现象类似。未孵化胚胎的表皮上没有体节出现，说明胚胎停滞于发育的早期。部分胚胎细胞核分裂不同步，且有染色质间桥出现，这也与 CI 胚胎中的细胞学表型一致。【结论】*Wolbachia* 感染可能抑制果蝇精子发生过程中 *Mst*84*Db* 基因的表达，从而使精子失去正常功能，最终导致与雌性果蝇交配后，胚胎发育停滞，并最终死亡。*Mst*84*Db* 基因在雄性果蝇中表达下调可能是产生 CI 的重要原因之一。

关键词：黑腹果蝇；*Wolbachia*；基因敲降；*Mst*84*Db*；细胞质不亲和

中图分类号：Q964　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**0454-6296(2014)03-0293-07

Paternal effects caused by the knockdown of *Mst*84*Db* mimic cytoplasmic incompatibility induced by *Wolbachia* in *Drosophila melanogaster*

WANG Cui-Ping, ZHENG Ya, ZHENG Jin-Jing, WANG Yu-Feng* (Hubei Key Laboratory of Genetic Regulation and Integrative Biology, College of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan 430079, China)

Abstract:【Aim】*Wolbachia* bacteria are maternally-inherited endosymbionts frequently found in insects. They can alter their hosts' reproduction *via* several forms. Cytoplasmic incompatibility (CI) is the most commonly reported phenotype caused by *Wolbachia* infection and induces developmental arrest of early embryos resulting from mating between *Wolbachia*-infected males and uninfected females. The molecular mechanisms of CI, however, are not clear currently. Our previous studies showed that the *Mst*84*Db* gene exhibited significant down-regulation in the 3rd instar larval testes of *Drosophila melanogaster* when infected by *Wolbachia*. The objective of this research is to further assay whether *Mst*84*Db* gene is associated with CI. 【Methods】In this study, we first synthesized the *Mst*84*Db* dsRNA *in vitro* and microinjected into male flies. Then we tested the fertility of these injected males by crossing with wild type females. Gene expression levels were examined by quantitative RT-PCR (qRT-PCR). The embryonic phenotypes were analyzed by DAPI staining. 【Results】The expression level of *Mst*84*Db* was significantly down-regulated since 24 h after injecting *Mst*84*Db* dsRNA. At 72 h after injection, the expression level of *Mst*84*Db* exhibited the maximum down-regulation relative to the control. The knockdown of *Mst*84*Db* in males significantly decreased the hatch rate of embryos when crossed with wild type females. This is similar to the phenotype in CI crosses. In addition, the embryonic cuticles showed almost no segmental development, indicating that some embryos stop development at early stages.

基金项目：国家自然科学基金项目（31172155）

作者简介：王翠平，女，1984 年生，河南周口人，硕士，研究方向为昆虫发育生物学，E-mail：378445346@qq.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: yfengw@mail.ccnu.edu.cn

收稿日期 Received：2013-12-09；接受日期 Accepted：2013-02-26

Obvious CI phenotypes with asynchronized nuclear division and chromatin bridges were also observed in part of early embryos derived from *Mst*84*Db* down-regulated males. 【Conclusion】*Wolbachia* infection may inhibit the expression of *Mst*84*Db* during spermatogenesis, thus reduces sperm fertility and leads to embryonic lethality. Down-regulation of *Mst*84*Db* in male *Drosophila* might be causally linked to CI.

Key words: *Drosophila melanogaster*; *Wolbachia*; gene knockdown; *Mst*84*Db*; cytoplasmic incompatibility

沃尔巴克氏体 *Wolbachia* 是广泛存在于昆虫中的一类胞内共生菌，近年的研究表明，66%以上的节肢动物（主要是昆虫）种类都有 *Wolbachia* 感染（Hilgenboecker *et al*., 2008）。*Wolbachia* 能够通过多种方式调节宿主的生殖，如细胞质不亲和（cytoplasmic incompatibility，CI）、孤雌生殖、雌性化和杀雄等，使其在宿主种群内广泛传播（Serbus *et al*., 2008; Werren *et al*., 2008）。

CI 是 *Wolbachia* 引起的最普遍的表型，即感染了 *Wolbachia* 的雄性和未感染的雌性宿主交配后，受精卵不能正常发育，在胚胎期死亡。而感染了 *Wolbachia* 的雌性和未感染的雄性或感染同种 *Wolbachia* 的雄性宿主交配后则可以正常繁殖，产生带有 *Wolbachia* 的后代。细胞学研究表明，来自 CI 交配组胚胎的表型主要为，来自父本的染色体在卵裂时不能进行正常的复制和分离，从而形成染色质间桥（chromatin bridge）（Serbus *et al*., 2008）。关于 CI 的分子机制还不很清楚。研究表明，*Wolbachia* 可能对宿主的精核进行了修饰，当修饰后的精子进入到含有同种 *Wolbachia* 的卵子中时，卵中的同种 *Wolbachia* 能够挽救被修饰了的精核，使得配子之间可以相互融合产生后代。如果被 *Wolbachia* 修饰过的精子进入到未感染的卵子中，由于卵子中没有 *Wolbachia*，因此不能进行挽救（Bourtzis *et al*., 1998; Clark *et al*., 2008; Serbus *et al*., 2008）。近期的研究表明，受精后母源性组蛋白 H3.3 不能及时进入精核，可能是 CI 胚胎中来自父本的染色体不能及时解除浓缩状态，无法参与到卵裂过程的原因（Landmann *et al*., 2009）。这说明，在 *Wolbachia* 感染的雄体中，精子发生过程可能受到了影响。本实验室近期的研究发现，编码组蛋白 H3.3 的伴侣蛋白 HIRA 的基因 *Hira*（组蛋白调节基因）在 *Wolbachia* 感染的雄性果蝇表达显著下调可能是 CI 产生的原因之一（Zheng *et al*., 2011a）。此外，本实验室前期通过 microarray 分析还发现，感染和未感染 *Wolbachia* 的果蝇早期精巢中，基因表达有很大的差异，其中与精子发生和受精相关的基因大多发生了下调（Zheng *et al*., 2011b），包括 *Mst*84*Db* 基因。

*Mst*84*Db*（*CG*17934）是位于果蝇 3 号染色体右臂 84D 区的一个基因，与 *Mst*84*Da*，*Mst*84*Dc* 和 *Mst*84*Dd* 一起组成一个串联基因簇，该基因簇仅在雄性生殖系中特异表达，编码的蛋白质主要包含一个重复的 Cys-Gly-Pro（CGP）基序。该簇基因缺失的果蝇虽然仍能产生可移动的精子，但电子显微镜检测显示，其中很多精子形态异常，如尾部轴丝外周的二联体断裂，出现不完整的环，偶尔还发现轴丝中间有两对中央微管等，从而导致有活动能力的精子数量大大下降（Kuhn *et al*., 1991）。然而，关于 *Mst*84*Db* 的具体功能还未见相关研究报道。

为研究 *Mst*84*Db* 的功能及与 CI 的关系，我们体外合成了 *Mst*84*Db* 的双链 RNA（dsRNA），采用基因敲降的方法研究其对黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 雄性繁殖的影响，发现注射 dsRNA 后，*Mst*84*Db* 基因的表达水平显著下调，基因敲降后的雄蝇与雌蝇交配后胚胎孵化率显著低于对照组，部分胚胎中细胞核分裂不同步，且有染色质间桥出现，这与 *Wolbachia* 诱导的 CI 现象类似。本研究不但可以为 *Wolbachia* 引起的 CI 分子机制研究提供思路，而且可以为动物生殖细胞发生调控机制及共生菌与其宿主间的相互作用的研究奠定基础，在性别控制、农业害虫和媒介昆虫的生物防治等领域，也具有重要的应用价值。

1　材料与方法

1.1　材料

本实验所用黑腹果蝇都是在 25℃ 左右的培养箱中用玉米粉-红糖培养基饲养的。由于果蝇密度会影响 CI 强度，所以每个 150 mL 的锥形瓶中待果蝇产大约 200 粒卵时就把成蝇去除。感染了 *w*Mel *Wolbachia* 的黑腹果蝇（Dmel *w*Mel）来自澳大利亚莫纳什大学（Monash University）Scott O'Neill 教授实验室，在本实验室保存至今。去除 *Wolbachia* 的果蝇品系，名称缩写为 Dmel T，作为野生型对照。果蝇体内的 *Wolbachia* 用四环素处理去除，用 PCR 方法检测 *Wolbachia* 的去除与否。为保证完全去除果蝇

体内的 *Wolbachia*，用含有四环素的培养基连续饲养果蝇 2 代，然后用正常饲料常规方法饲养 3 代以上，以排除四环素的影响（彭宇和王玉凤，2009）。

本实验所用引物均采用 Primer Premier 5.0 软件设计，由生工生物（上海）有限公司和上海 Invitrogen 公司合成，引物序列如表 1。

表 1　本研究所用引物

Table 1　Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列（5′－3′） Primer sequence	引物用途 Use of primers
rp-49 F	CGGTTACGGATCGAACAAGC	定量 RT-PCR，内参 qRT-PCR, reference gene
rp-49 R	CTTGCGCTTCTTGGAGGAGA	定量 RT-PCR，内参 qRT-PCR, reference gene
wsp 81F	TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC	PCR 检测 *Wolbachia* 感染情况 PCR detection of *Wolbachia* infection
wsp 691R	AAAAATTAAACGCTACTCCA	PCR 检测 *Wolbachia* 感染情况 PCR detection of *Wolbachia* infection
Mst84Db T7F	gcgtaatacgactcactataggCGGACCCCTTGGATTCTG	合成双链 RNA Synthesis of dsRNA
Mst84Db T7R	gcgtaatacgactcactataggCAGCACCCGCAATATGGC	合成双链 RNA Synthesis of dsRNA
Mst84Db F	CGGACCCCTTGGATTCTG	合成双链 RNA；定量 RT-PCR Synthesis of dsRNA; qRT-PCR
Mst84Db R1	CAGCACCCGCAATATGGC	合成双链 RNA Synthesis of dsRNA
Mst84Db R2	CGCCGCACGGGCTACAG	定量 RT-PCR qRT-PCR

1.2　RNA 提取及双链 RNA（dsRNA）的制备

用 Trizol RNA 提取试剂盒（invitrogen 公司）提取果蝇的总 RNA。在测定 RNA 浓度后，取 1 μg 总 RNA 样品，用 Oligo（dT）$_{18}$引物（TaKaRa）及逆转录酶 M-MLV（Invitrogen 公司）合成 cDNA 第一链。通过 RT-PCR 检测模板 cDNA 的质量。

以 cDNA 为模板，分别用两对干扰引物（Mst84Db T7F，Mst84Db R1；Mst84Db F，Mst84Db T7R），通过 PCR 扩增得到两条合成 dsRNA 的 DNA 模板。PCR 反应体系包括：0.5 μL 的 Ex Taq（5 U/μL）；10 μL 的 10 × Ex Taq Buffer；8 μL dNTPs；0.4 μL 引物（10 μmol/L）；4 μL cDNA；加水补足至 100 μL。PCR 反应程序为：95℃ 预变性 5 min；94℃ 变性 30 s，60℃退火 30 s，72℃延伸 30 s，共 35 个循环；最后于 72℃下延伸 10 min。用酚/氯仿抽提法纯化 PCR 产物。

按照 MEGAscript® RNAi Kit（Ambion）中的操作程序体外转录为单链 RNA（ssRNA）。37℃过夜转录后，把两个管中的反应液混合到一个管中，混匀，75℃水浴 10 min，取出后在室温下放置冷却退火，合成 dsRNA。用 DNase I 和 RNase A 分别于 37℃水浴 1 h 降解 DNA 和 ssRNA。用酚/氯仿抽提法纯化。电泳检测，并取 1 μL 用于测 OD 值和浓度，以检测 dsRNA 的纯度和浓度。

1.3　dsRNA 的注射

有文献表明，4－6 日龄果蝇基因干扰效果较好（Goto *et al.*，2003），因此我们选取了 4－6 日龄雄蝇，用二氧化碳麻醉后，使其腹面朝上，在解剖镜下由腹部中外侧进行注射。所用注射仪为日本 NARISHIGE 的 MN-153 型，注射针由玻璃毛细管通过 NARISHIGE 的 PC-10 拉针仪拉制而成。每头果蝇注射约 400 ng dsRNA，同时注射 RNase-free H_2O 作为对照。共注射约 1 000 头果蝇。注射后的雄蝇先放在 19℃培养箱里培养 12 h，之后转到 25℃培养箱中培养。

1.4　qRT-PCR 检测基因表达水平

选用 SYBR Green II Dye，用 BIO-RAD 荧光定量 PCR 仪进行荧光定量 PCR。反应体系包括：SYBR 10 μL，cDNA 模板 2 μL，10 μmol/L 上、下游引物各 0.3 μL，加 ddH_2O 补至 20 μL。反应条件为：95℃预热 30 s，再经过 40 个循环，每个循环过程为 95℃ 10 s，60℃ 30 s，72℃ 20 s。最后溶解曲线从 55～98℃每 0.2℃读 1 s，同时进行 ROX 值校正。反应结束后，读取 Ct 值。

利用荧光曲线值和 Ct 值就可以计算 *Mst84Db*

基因的相对表达量，以 *rp*49 基因为内参。两者的差异倍数被定义为 $2^{-\triangle\triangle Ct}$，其中 $\triangle\triangle Ct = (Ct_{Mst84Db} - Ct_{rp49})$ 实验组 $-$ $(Ct_{Mst84Db} - Ct_{rp49})$ 对照组。每种样品做 3 个生物学重复。

1.5 胚胎孵化率的测定

分别在注射后 24，48，72 和 96 h，将 15 头雄果蝇与处于产卵高峰期的 45 头 Dmel T 处女蝇交配（雌雄比为 3∶1），交配 12 h 后去除雄蝇，雌蝇继续产卵，待产卵约 200 粒时去除雌蝇。将胚胎收集盘放在 25℃的培养箱中培养 36 h，使所有正常胚胎都孵化后，再在解剖镜下统计胚胎孵化率。每个时间点做 3 个重复。

1.6 胚胎表皮制备

用胚胎洗涤液（0.04% NaCl，0.03% Triton X-100）洗干净胚胎，加入 50% 的漂白剂浸泡 3 ~ 5 min，去除漂白剂，再用胚胎洗涤液清洗。然后，将胚胎置于含 1∶1 的庚烷：甲醇（v/v）的 EP 管，用力震荡使胚胎沉到管底。去除甲醇和庚烷，用 PBTw（PBS + 0.1% 的 Triton X-100）清洗两次。用移液枪把胚胎移到载玻片上，并小心去除多余的 PBTw。加入 30 μL 的 Hoyer's medium［或者 Hoyer's medium 与乳酸 1∶1（v/v）的混合液］，盖上盖玻片，把载玻片置于 55 ~ 60℃ 烘箱中烘烤 1 h 或过夜。在莱卡（Leica）DM 4000B 显微镜下观察、拍照。

1.7 胚胎 DAPI 染色

在胚胎收集盘上收集 0 ~ 15 min 的胚胎，用胚胎洗涤液洗净，加入 50% 的漂白液漂洗 1 ~ 5 min，去除卵壳，再用胚胎洗涤液清洗。将胚胎转入含 1∶1 庚烷和甲醇（v/v）的 EP 管中，剧烈震荡 20 s，以便除去卵黄膜。将上面的液体和胚胎吸去，除去卵黄膜的胚胎位于管底。在管中加入 4% 的多聚甲醛（PBS 配制，pH 7.4），室温下固定 20 min，用移液枪吸干多聚甲醛。将已固定的胚胎用冰甲醇洗 3 次，然后加入 1 mL 甲醇，存于 −20℃保存，备用。

染色前将胚胎用 −20℃冻存的丙酮洗 5 min，然后用 PBST（PBS + 0.1% Triton X-100）洗 3 次，每次 10 min。加入 DAPI，室温避光染色 30 min；用 PBST 洗 5 次，每次 10 min。用移液枪把胚胎移到载玻片上，小心吸去 PBST。用 90% 磷酸-甘油封片，在 Leica DM 4000B 显微镜下观察、拍照。

1.8 数据统计与分析

实验数据以平均值 ± 标准误表示（n = 3），平均值的差异显著性分析采用 *t* 检验法，设 $P < 0.05$ 为差异显著，$P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 注射 dsRNA 显著降低了 *Mst84Db* 基因的表达水平

体外合成 *Mst84Db* 的 dsRNA 后，取 4 − 6 日龄 Dmel T 雄蝇在 CO_2 麻醉下进行注射。通过 qRT-PCR 的方法检测在注射 dsRNA 后 *Mst84Db* 基因的表达水平，结果如图 1 所示。从图中可看出，在注射 dsRNA 24 h 后，与对照（注射 RNase-free H_2O）组相比，注射 dsRNA 组雄蝇的 *Mst84Db* 基因表达显著下调（$P < 0.01$），随着时间的推移，在注射后 48 h 和 72 h 后，*Mst84Db* 基因的表达进一步下调（$P_{48h} = 0.002759$，$P_{72h} = 0.000155$），特别是在注射后 72 h 下调幅度最大，*Mst84Db* 基因的表达量仅为对照组的 10.8%，干扰效果最好。在注射 dsRNA 96 h 后 *Mst84Db* 基因的表达较前期略有回升，说明干扰作用开始减弱，基因表达开始恢复，此时 *Mst84Db* 基因的表达量为对照组的 17.6%。

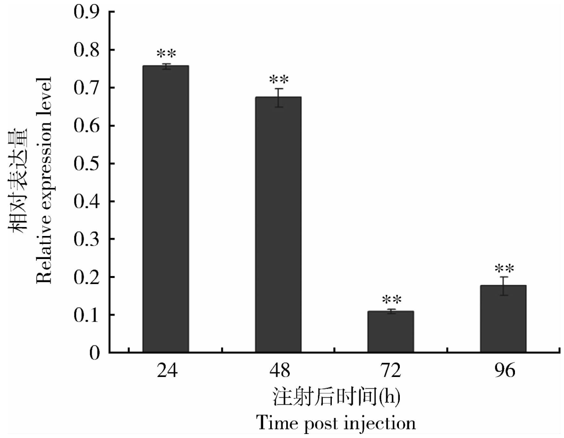

图 1 注射 *Mst84Db* dsRNA 不同时间后黑腹果蝇体内 *Mst84Db* 的表达水平

Fig. 1 The relative expression level of *Mst84Db* in *Drosophila melanogaster* at different time after injection with *Mst84Db* dsRNA

以对照组（注射无 RNase 的水）的表达水平设为标准；柱上双星号表示注射后不同时间与对照间差异显著（*t* 检验，$P < 0.01$）。The expression level of *Mst84Db* in the control (injection with RNase-free H_2O) is set as 1. Double asterisks above bars indicate significant difference between the dsRNA-injected group and the control at different time after injection (*t*-test, $P < 0.01$).

2.2 *Mst84Db* 基因敲降对雄果蝇繁殖力的影响

为了研究 *Mst84Db* 基因敲降对雄果蝇繁殖力的影响，我们统计了注射 dsRNA 后不同时间的雄蝇与 Dmel T 处女蝇交配后胚胎的孵化率，结果如图 2 所

示。从图中可观察到,注射 *Mst84Db* 的 dsRNA 后的雄果蝇交配组,胚胎孵化率都比对照组低。在注射 dsRNA 24 h 后差异达到显著水平($P<0.05$);在注射 dsRNA 48,72 和 96 h 后,与对照相比,注射 dsRNA 后的雄果蝇交配组胚胎孵化率都极显著低于对照组($P<0.01$)。且在注射后 72 h 的雄蝇交配组中,胚胎孵化率下降最多,为对照组的 59.7%。

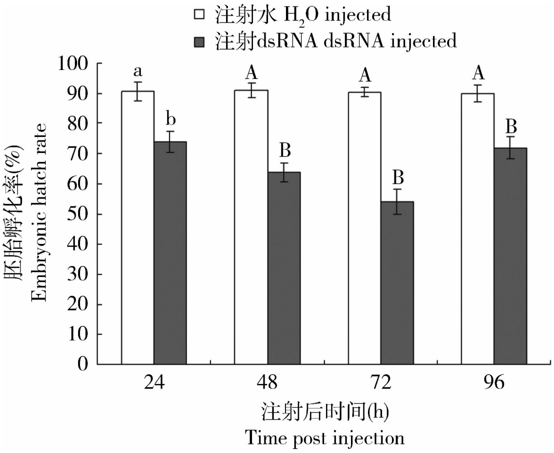

图 2　黑腹果蝇雌蝇与注射 *Mst84Db* dsRNA 不同时间后的雄蝇交配后所产胚胎的孵化率

Fig. 2　The hatch rates of the embryos derived from *Drosophila melanogaster* fathers at different time after injection with *Mst84Db* dsRNA

柱上不同大写和小写字母分别表示处理与对照(注射无 RNase 的水)间差异极显著($P<0.01$)和显著(t 检验,$P<0.05$)。Different capital and lowercase letters above bars indicate extremely significant difference ($P<0.01$) and significant difference (t-test, $P<0.05$) between the treatment and the control (RNase-free H_2O injected), respectively.

2.3　*Mst84Db* 基因敲降对胚胎发育的影响

为了研究 Dmel T 处女蝇与注射 *Mst84Db* dsRNA 后雄果蝇交配后所产的胚胎中,未孵化胚胎死亡的时期,我们收集了胚胎,制备其表皮(图 3)。从图中可以看出,这些表皮都几乎没有体节的出现,也没有头部口沟和尾部体节的出现,表明这些胚胎是在发育早期,即形成体节形成之前就停止发育了。

2.4　*Mst84Db* 基因敲降对雄蝇后代早期核分裂的影响

为了进一步研究 *Mst84Db* 敲降后雄蝇后代的致死的原因,我们选取干扰效果最明显时期的雄蝇,即注射 dsRNA 72 h 后的雄蝇作为父本,与产卵高峰期的 Dmel T 处女蝇交配。收集它们的早期胚胎并进行 DAPI 染色。荧光显微镜下观察发现,对照组胚胎细胞核分裂同步、彻底,核在胚胎中分布比较均匀(图 4：A)。而 *Mst84Db* 敲降后雄蝇后代的部分胚胎早期细胞核分裂不同步,有的细胞核分裂已完成,两个子核已分离开,而有的细胞核分裂还未完成,两个子核没有完全分离,形成染色质间桥(图 4：B,箭头所示)。这表明 *Mst84Db* 敲降后雄蝇后代的部分胚胎早期核分裂异常,可能因而导致胚胎不能正常发育而死亡。

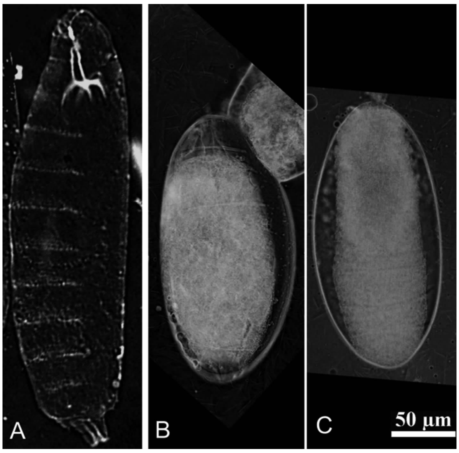

图 3　黑腹果蝇 *Mst84Db* 敲降雄蝇后代中未孵化胚胎表皮

Fig. 3　Cuticles of unhatched eggs from *Mst84Db* knockdown fathers of *Drosophila melanogaster*

A：对照(注射无 RNase 的水)Control (RNase-free H_2O injected); B, C：注射 *Mst84Db* dsRNA (*Mst84Db* dsRNA injected).

3　讨论

本研究组前期基因芯片分析、qRT-PCR 检测和原位杂交实验都表明,与未感染 *Wolbachia* 的果蝇相比,感染 *Wolbachia* 的果蝇 3 龄幼虫精巢中 *Mst84Db* 的表达量显著下降。为了进一步研究其功能,我们采用了基因敲降技术对果蝇中的 *Mst84Db* 基因进行了干扰。有研究表明,胞外注射 dsRNA 到果蝇幼虫中,在大部分果蝇组织中不能产生干扰效果,只有一种幼虫细胞类型即血细胞能吸收注射的 dsRNA,大部分的果蝇幼虫组织缺乏从周围环境中吸收 dsRNA 的能力(Miller *et al.*, 2008)。尽管 dsRNA 的幼虫注射对很多果蝇组织是无效的,但已有报道证明,在成蝇中注射 dsRNA 进行基因干扰取得了成功(Dzitoyeva *et al.*, 2001; Goto *et al.*, 2003; Petruk *et al.*, 2006),这说明不同的发育阶段,组织可能具有不同的特性。这种幼虫和成蝇组织的差异性的基础虽然目前还未知,但可能是由于各组织类型间的基本发育差异,如细胞的倍性,或者由于dsRNA吸

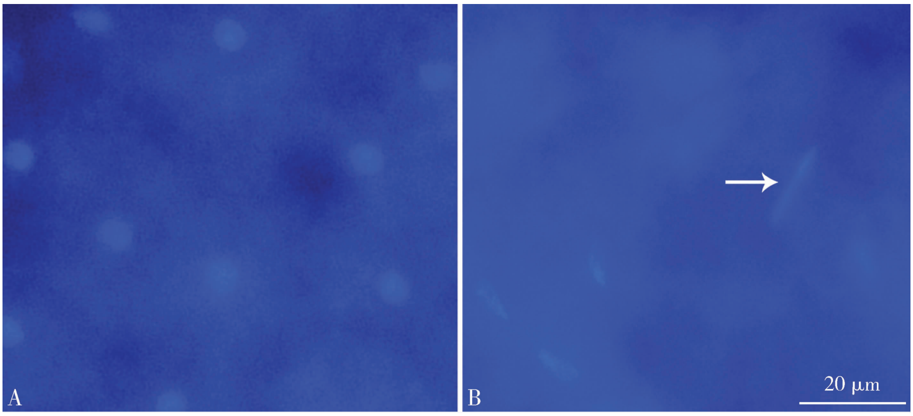

图 4　黑腹果蝇 ds*Mst*84*Db* 敲降雄蝇与未感染雌蝇交配后代早期胚胎的核分裂表型

Fig. 4　Nuclei division in early embryos derived from the crosses of *Mst*84*Db* knockdown male flies with Dmel T females of *Drosophila melanogaster*

A：注射无 RNA 酶的水的雄蝇后代胚胎，核分裂同步，在胚胎中分布比较均匀 Control embryos derived from the crosses of male flies injected with RNase-free H_2O, showing evenly distributed nuclei. B：注射 *Mst*84*Db* dsRNA 的雄蝇后代胚胎，箭头表示染色质间桥 Embryos derived from the crosses of male flies injected with *Mst*84*Db* dsRNA, and the arrow indicates chromatin bridge.

收或转运所需的蛋白表达的差异所造成的。因此，我们选择果蝇成蝇来注射 dsRNA。已有研究表明，在成蝇中，dsRNA 沉默基因的效率随着成蝇日龄的不同而有差异，在羽化后 4 日龄之前注射 dsRNA，检测不到相应基因表达水平有显著降低，而注射 5 – 6 日龄果蝇干扰效果最好（Goto *et al*., 2003）。因此，我们最终选择 4 – 6 日龄成蝇来进行 dsRNA 注射。本研究发现，在注射 *Mst*84*Db* 基因的 dsRNA 24 h 后，*Mst*84*Db* 的表达量就极显著下降（$P < 0.01$），在 72 h 后下调幅度最大，表明对 4 – 6 日龄成蝇进行 dsRNA 的注射，能够取得很好的基因干扰效果，这与前人的研究结果一致（Dzitoyeva *et al*., 2001；Goto *et al*., 2003）。

Kuhn 等（1991）的研究表明，*Mst*84*Db* 所在基因簇在雄性生殖系中特异表达并且与精子的运动能力有关。进一步的研究表明，在 *Mst*84*Db* 基因内，不仅具有转录控制元件，还有翻译抑制元件（Gigliotti *et al*., 1997），这表明它的表达受自身调控。本研究组前期实验表明，*Wolbachia* 感染导致果蝇 3 龄幼虫精巢中 *Mst*84*Db* 基因表达显著下调，这表明 *Wolbachia* 感染能抑制 *Mst*84*Db* 在精巢中的表达。本研究采用注射 *Mst*84*Db* 基因的 dsRNA 的方法，使得果蝇 *Mst*84*Db* 基因表达显著下调，用干扰后的雄蝇与未感染的处女蝇交配，发现 *Mst*84*Db* 基因表达下调的雄蝇后代胚胎孵化率显著降低，这与 *Wolbachia* 感染引起果蝇 CI 的表型一致。然而，尽管在注射后 72 h，*Mst*84*Db* 基因的表达量仅为对照组的 10.8%，但此时的雄蝇交配组中，胚胎孵化率仍为对照组的近 60%，说明单独敲降 *Mst*84*Db* 基因对雄蝇生殖力的影响不是特别严重，其他基因（如与其一起组成串联基因簇的其他 *Mst*84*D* 基因）也在雄蝇生殖力方面起重要作用，可能在很大程度上补偿了 *Mst*84*Db* 基因敲降所引起的缺陷。

为研究 *Mst*84*Db* 基因表达下调的雄蝇后代胚胎死亡的原因，我们首先观察了胚胎的表皮，发现死亡胚胎的表皮都呈现早期胚胎表皮的表型，没有明显的体节出现，说明这些胚胎的发育停滞于胚胎发育早期阶段。这也与 CI 的表型一致。

果蝇早期胚胎发育的一个主要的特点就是核分裂快速且同步，分裂后的细胞核几乎是均匀地分布在胚胎中。本研究对 *Mst*84*Db* 基因表达下调的雄蝇后代胚胎进行 DAPI 染色，发现部分胚胎细胞核分裂不同步，且有染色质间桥出现，这与 *Wolbachia* 感染引起果蝇 CI 胚胎中的细胞学表型一致（Zheng *et al*., 2011a）。已有细胞学研究表明，CI 胚胎在第一次核分裂时就呈现异常表型，由于雌雄原核发育不同步，雄性原核的核膜破裂时间要晚于雌性原核，这就使得父本的染色体分离异常，有丝分裂后期出现染色质间桥，最终形成非整倍染色体组的胚胎，导致胚胎无法正常发育（Lassy and Karr, 1996；Callaini *et al*., 1997；Tram and Sullivan, 2002；Tram *et al*., 2006）。Riparbelli 等（2007）在感染的果蝇精巢中确实观察到一些发育异常的精子，如核定位异常、尾部轴丝方向混

乱、精子之间不能分开等。可能正是由于这些精子的异常，才使得 *Wolbachia* 感染的雄蝇与正常未感染雌蝇交配后胚胎不能正常发育，即引起 CI。Snook 等(2000)研究发现，*Wolbachia* 感染的拟果蝇精巢中精子数量要比未感染的拟果蝇精巢少 40%，尤其是在感染了 *Wolbachia* 的、表现较强 CI 表型的“年青”雄果蝇中。Kuhn 等(1991)的研究发现，包含 *Mst*84*Db* 基因在内的基因簇缺失突变导致雄性果蝇精子出现异常，有活动能力的精子数量大大下降。因此，*Wolbachia* 感染可能通过抑制精子发生过程中 *Mst*84*Db* 基因的表达，从而使精子数量、结构和功能发生异常，最终导致与正常雌性交配后胚胎孵化率严重下降。*Wolbachia* 感染导致的 *Mst*84*Db* 的表达下调可能是引起 CI 的分子机制之一。至于 *Wolbachia* 是通过何种途径导致 *Mst*84*Db* 的表达下调，还有待于进一步的深入研究。

参考文献（References）

Bourtzis K, Dobson SL, Braig HR, O'Neill SL, 1998. Rescuing *Wolbachia* have been overlooked. *Nature*, 391(6670): 852 - 853.

Callaini G, Dallai R, Riparbelli MG, 1997. *Wolbachia*-induced delay of paternal chromatin condensation does not prevent maternal chromosomes from entering anaphase in incompatible crosses of *Drosophila simulans*. *J. Cell Sci.*, 110(Pt 2): 271 - 280.

Clark ME, Bailey-Jourdain C, Ferree PM, England SJ, Sullivan W, Windsor DM, Werren JH, 2008. *Wolbachia* modification of sperm does not always require residence within developing sperm. *Heredity*, 101: 420 - 428.

Dzitoyeva S, Dimitrijevic N, Manev H, 2001. Intra-abdominal injection of double-stranded RNA into anesthetized adult *Drosophila* triggers RNA interference in the central nervous system. *Mol. Psychiatry*, 6(6): 665 - 670.

Gigliotti S, Balz V, Malva C, Schäfer MA, 1997. Organisation of regulatory elements in two closely spaced *Drosophila* genes with common expression characteristics. *Mech. Dev.*, 68(1 - 2):101 - 113.

Goto A, Blandin S, Royet J, Reichhart J, Levashina EA, 2003. Silencing of toll pathway components by direct injection of double-stranded RNA into *Drosophila* adult flies. *Nucleic Acids Res.*, 31(22): 6619 - 6623.

Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A, Werren JH, 2008. How many species are infected with *Wolbachia*? A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol. Lett.*, 281: 215 - 220.

Kuhn R, Kuhn C, Borsch D, Glatzer KH, Schafer U, Schafer M, 1991. A cluster of four genes selectively expressed in the male germ line of *Drosophila melanogaster*. *Mech. Dev.*, 35: 143 - 151.

Landmann F, Orsi GA, Loppin B, Sullivan W, 2009. *Wolbachia* mediated cytoplasmic incompatibility is associated with impaired histone deposition in the male pronucleus. *PLoS Pathog.*, 5: e1000343.

Lassy CW, Karr TL, 1996. Cytological analysis of fertilization and early embryonic development in incompatible crosses of *Drosophila simulans*. *Mech. Dev.*, 57: 47 - 58.

Miller SC, Brown SJ, Tomoyasu Y, 2008. Larval RNAi in *Drosophila*? *Dev. Genes Evol.*, 218(9): 505 - 510.

Peng Y, Wang YF, 2009. Infection of *Wolbachia* may improve the olfactory response of *Drosophila*. *Chin. Sci. Bull.*, 54(8): 1369 - 1375.［彭宇，王玉凤，2009. *Wolbachia* 感染显著提高果蝇嗅觉反应. 科学通报，54(5): 596 - 602］

Petruk S, Sedkov Y, Riley KM, Hodgson J, Schweisguth F, Hirose S, Jaynes JB, Brock HW, Mazo A, 2006. Transcription of *bxd* noncoding RNAs promoted by trithorax represses *Ubx* in *cis* by transcriptional interference. *Cell*, 127(6): 1209 - 1221.

Riparbelli MG, Giordano R, Callaini G, 2007. Effects of *Wolbachia* on sperm maturation and architecture in *Drosophila simulans* Riverside. *Mech. Dev.*, 124: 699 - 714.

Serbus LR, Casper-Lindley C, Landmann F, Sullivan W, 2008. The genetics and cell biology of *Wolbachia*-host interactions. *Ann. Rev. Genet.*, 42: 683 - 707.

Snook RR, Cleland SY, Wolfner MF, Karr TL, 2000. Offsetting effects of *Wolbachia* infection and heat shock on sperm production in *Drosophila simulans*: analyses of fecundity, fertility and accessory gland proteins. *Genetics*, 155: 167 - 178.

Tram U, Sullivan W, 2002. Role of delayed nuclear envelope breakdown and mitosis in *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility. *Science*, 296: 1124 - 1126.

Tram U, Fredrick K, Werren JH, Sullivan W, 2006. Paternal chromosome segregation during the first mitotic division determines *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility phenotype. *J. Cell Sci.*, 119: 3655 - 3663.

Werren JH, Baldo L, Clark ME, 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat. Rev. Microbiol.*, 6: 741 - 751.

Zheng Y, Ren PP, Wang JL, Wang YF, 2011a. *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility is associated with decreased *Hira* expression in male *Drosophila*. *PLoS ONE*, 6(4): e19512.

Zheng Y, Wang JL, Liu C, Wang CP, Walker T, Wang YF, 2011b. Differentially expressed profiles in the larval testes of *Wolbachia* infected and uninfected *Drosophila*. *BMC Genomics*, 12: 595 - 607.

（责任编辑：赵利辉）